

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :  
(A n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction).

**2 304 326**

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 76 07872**

(54) Particules submicroscopiques comportant une substance biologiquement active, leur préparation et leur application thérapeutique.

(51) Classification internationale (Int. Cl.<sup>2</sup>). A 61 K 9/00.

(22) Date de dépôt ..... 18 mars 1976, à 15 h 32 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Demandes de brevets déposées en Suisse le 20 mars 1975, n. 3.573/75 et le 13 mai 1975, n. 6.125/75 aux noms des demandeurs.

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande ..... B.O.P.I. — «Listes» n. 42 du 15-10-1976.

(71) Déposant : KREUTER Jörg et SPEISER Peter Paul, résidant en Suisse.

(72) Invention de :

(73) Titulaire : Idem (71)

(74) Mandataire : Beau de Loménie, 55, rue d'Amsterdam, 75008 Paris.

L'invention a pour objet des particules submicroscopiques contenant une substance biologiquement active et une matière polymérisée, leur préparation et leur application comme préparations médicamenteuses à action prolongée.

5 L'invention concerne plus particulièrement des particules submicroscopiques contenant une matière polymérisée acceptable physiologiquement et une substance biologiquement active, lesdites particules formant une solution colloïdale ou une suspension dans un milieu liquide hydrophile ou hydrophobe, caractérisées en ce que la substance biologiquement  
10 active est enrobée totalement ou partiellement par la matière polymérisée, ou adsorbée sur des particules submicroscopiques de matière polymérisée.

Par particules de dimensions submicroscopiques, on  
15 entend des particules ayant un diamètre inférieur à 500 nm, de préférence compris entre 50 et 300 nm.

Conformément au procédé de l'invention, pour préparer ces particules submicroscopiques,

- 20 a) on mélange une suspension, une émulsion, une solution ou une solution colloïdale dans un milieu liquide d'une substance biologiquement active éventuellement adsorbée sur un support, avec une matière polymérisable soluble dans le milieu liquide utilisé et 0 à 3% en poids d'un stabilisant, puis on soumet le mélange à des conditions entraînant la  
25 polymérisation de la matière polymérisable, ce qui donne des particules submicroscopiques de substance biologiquement active enrobée totalement ou partiellement par une couche de matière polymérisée, ou
- 30 b) on met en suspension des particules submicroscopiques de matière polymérisée dans un milieu liquide contenant la substance biologiquement active, ce qui donne des particules submicroscopiques de polymère sur lesquelles la substance biologiquement active est adsorbée.

Par polymérisation, on entend la polymérisation ou  
35 la copolymérisation de monomères, la polycondensation de monomères ou de prépolymères ou la coacervation qui permet de

transformer un polymère soluble en polymère insoluble.

Comme matières polymérisables appropriées pour le procédé spécifié sous a), on peut utiliser des monomères tels que le styrène, la vinylpyrrolidone, les dérivés de l'acide acrylique ou méthacrylique, comme par exemple l'acrylate de méthyle, l'acrylate de butyle, l'acrylamide, le méthacrylate de méthyle, le méthacrylate de butyle ou le méthacrylamide, ou un mélange de ces composés, comme par exemple le mélange méthacrylate de méthyle/acrylamide. Comme prépolymères solubles appropriés, on peut citer les prépolymères d'urée-formol, des aminoplastes et des phénoplastes et, comme matières appropriées pour la coacervation, la gélatine et la caséine.

On utilise de préférence, comme matière polymérisable, le méthacrylate de méthyle ou le mélange méthacrylate de méthyle/acrylamide. On peut également employer le styrène et les autres monomères acryliques; toutefois, les acides acrylique et méthacrylique, en raison de leur fonction acide, peuvent altérer les substances biologiquement actives.

La matière polymérisable utilisée doit présenter une certaine solubilité dans le milieu liquide; cependant, la matière polymérisable peut n'être que faiblement soluble dans le milieu liquide. Comme milieu liquide, on utilise de préférence l'eau où la solubilité par exemple du méthacrylate de méthyle est de 15 g/l à la température ambiante, une solution aqueuse d'un tampon physiologique, comme par exemple un tampon au phosphate, ou une solution physiologique de chlorure de sodium.

La polymérisation est effectuée de préférence en l'absence d'un stabilisant. Toutefois, on peut utiliser un stabilisant, de préférence un agent tensio-actif, comme par exemple le sulfosuccinate de di-(2-éthylhexyle) sous forme de sel de sodium (Aerosol OT), pour émulsionner la substance biologiquement active ou la matière polymérisable. La quantité de stabilisant à utiliser ne doit pas excéder 3% en poids du milieu réactionnel; elle est de préférence inférieure à 1%, plus particulièrement inférieure à la concentration micellaire

critique. Ainsi, pour le méthacrylate de méthyle dans l'eau, cette concentration est d'environ 0,1% en poids de l'eau.

Comme substance biologiquement active appropriée, on peut citer les antigènes, les protéines, les virus, les bactéries, les cellules ou les constituants de virus, de bactéries ou de cellules. On utilise de préférence des substances appropriées pour l'administration par voie parentérale et capables de conférer une immunisation contre les maladies infectieuses. Les substances particulièrement préférées sont les vaccins contre la grippe, notamment les vaccins contenant des composants des virus de la grippe.

L'expression "substance biologiquement active" comprend également des substances chimiques douées de propriétés pharmacologiques, en particulier des composés à haut poids moléculaire. Comme exemples de tels composés, on peut citer les peptides, comme par exemple l'insuline, et les stéroïdes, en particulier les hormones stéroïdes.

Lorsqu'on effectue la polymérisation selon la méthode spécifiée sous a) de substances destinées à l'administration par voie parentérale, il faut tenir compte de la fragilité de la substance biologiquement active mise en jeu; en particulier, il est recommandé de procéder de telle manière que le produit final soit très pur, bien défini et contienne le moins possible de produits secondaires. On peut par exemple effectuer une réaction de polymérisation initiée par des rayons  $\gamma$  par des rayons ultra-violets ou par la lumière visible, éventuellement en présence d'un initiateur ou d'un catalyseur appropriés. La réaction de polymérisation est effectuée de préférence sous une atmosphère inerte, par exemple sous atmosphère d'azote. Lorsque le milieu réactionnel a tendance à se séparer au repos en deux phases, il convient d'opérer sous agitation vigoureuse. Toutefois, il importe que la substance biologiquement active ne soit ni altérée, ni désactivée par les radiations et/ou par le catalyseur éventuellement utilisés. Certaines substances biologiquement actives qui sont employées dans le procédé de l'invention, comme par exemple les antigènes, sont formées de

macromolécules qui sont instables à la chaleur, aux valeurs limites de pH, à l'oxydation ou à certaines radiations.

Pour ces raisons, il est donc avantageux dans de tels cas d'effectuer la polymérisation selon l'une des méthodes suivantes:

- I) polymérisation induite par les rayons  $\gamma$ , par exemple au moyen d'une source au  $^{60}\text{Co}$ , en l'absence d'un catalyseur; généralement, une dose d'environ 0,5 Mrad est suffisante pour polymériser une quantité de monomère atteignant 1 g;
- 10 II) polymérisation induite par un initiateur radicalaire hydro-soluble tel qu'un persulfate, lorsque la substance biologique est insensible à l'oxydation;
- III) polymérisation induite par irradiation de lumière visible, par exemple à l'aide d'une lampe incandescente de 300 watts et en présence de riboflavine (environ 0,01%) comme sensi-  
15 bilisateur et de persulfate de potassium comme catalyseur;
- IV) polymérisation induite par irradiation ultra-violette, lorsque la substance biologiquement active n'est pas dés-activée par la lumière ultra-violette. On a constaté par  
20 exemple que les protéines accélèrent la polymérisation [voir à ce sujet H.L. Needles, Polym.Letters 5, 595 (1967)].

De petites quantités de méthacrylate de méthyle ou du mélange méthacrylate de méthyle/acrylamide sont nécessaires pour l'enrobage des substances biologiquement actives lorsqu'on  
25 utilise ces monomères comme matière polymérisable. Ainsi, pour une suspension aqueuse d'un vaccin à la concentration habituellement utilisée pour une administration par voie parenté-rale, par exemple pour un vaccin antigrippal ayant un degré d'hémagglutination compris entre  $2^{12}$  et  $2^{15}$ , on obtient un  
30 enrobage pratiquement total de cette substance active lorsqu'on utilise 2% en poids (par rapport au milieu réactionnel) de méthacrylate de méthyle. On obtient un enrobage partiel de la substance active lorsqu'on utilise par exemple de 0,25 à  
35 1% en poids (par rapport au milieu réactionnel) de matière polymérisable. Par enrobage partiel, on entend une répartition statistique de l'enrobage de telle sorte que certaines parti-

cules de substance active sont complètement enrobées et d'autres ne le sont pas.

Au cours de la réaction de polymérisation selon l'invention, la matière polymérisable s'agglutine tout d'abord  
5 à la surface solide ou solvatée des particules de substance biologiquement active, ceci en fonction des propriétés physico-chimiques telles que la polarité, la constante diélectrique, le coefficient de partage etc..., puis elle forme une enveloppe qui durcit par polymérisation. Par ailleurs, au cours du dur-  
10 cissement il peut se produire sur la substance active une addition des oligomères qui se forment ainsi qu'une adsorption de la substance active sur des unités plus grandes de polymères qui, au cours de la polymérisation subséquente, peuvent être incorporées dans les particules qui se forment. De cette  
15 manière, on obtient également une incorporation partielle ou une liaison par adsorption de la substance biologiquement active.

Lorsque les molécules de la substance active sont trop petites ou trop polaires, on adsorbe d'abord cette subs-  
20 tance active sur un support approprié puis on enrobe le tout selon le procédé de l'invention. Comme supports appropriés, on peut citer l'hydroxyde d'aluminium, le bol, la silice hydratée (par exemple le produit commercialisé sous le nom Aerosil) et les polymères acceptables physiologiquement, sous forme de  
25 particules submicroscopiques. On utilise de préférence, comme support, la même matière polymère que celle employée pour l'enrobage de la substance active.

Les particules submicroscopiques préparées selon le procédé de l'invention spécifié sous a) sont ensuite isolées  
30 du milieu réactionnel selon des méthodes connues et, le cas échéant, purifiées. Lorsqu'on opère sous certaines conditions, par exemple lorsque la polymérisation est effectuée à l'aide de rayons  $\gamma$  et en l'absence de catalyseur, on peut utiliser le mélange réactionnel tel quel, sans qu'il soit nécessaire de le  
35 purifier.

Toutefois, il importe de vérifier dans le produit

final la teneur des monomères de départ en raison de la toxicité de certains de ces produits. Cette vérification peut être effectuée selon la méthode décrite par F.E. Critchfield, G.L. Funk et J.B. Johnson dans Anal.chem. 28, 76 (1955).

5           Lorsque le produit final contient une quantité indésirable de monomères, il faut procéder à une purification supplémentaire. On peut éliminer les monomères par un lavage à l'aide d'un solvant dissolvant bien les monomères, les polymères restant insolubles. On concentre ensuite le produit par  
10       exemple par centrifugation, filtration ou dialyse puis on ajuste la concentration finale en fonction de l'utilisation désirée. Lorsqu'on se trouve en présence de monomères volatiles tels que le méthacrylate de méthyle ou le styrène, ceux-ci peuvent être éliminés par évaporation sous pression réduite ou  
15       par lyophilisation.

          Dans le procédé spécifié sous b), le milieu liquide peut être hydrophile ou hydrophobe; on opère de préférence dans l'eau, dans une solution aqueuse d'un tampon physiologique comme par exemple un tampon au phosphate, ou dans une solution  
20       physiologique de chlorure de sodium.

          Les particules submicroscopiques de polymère utilisées dans ce procédé, sont obtenues de préférence en dissolvant, en émulsionnant ou en mettant en suspension le monomère dans un milieu liquide et en effectuant ensuite la polymérisation selon  
25       des méthodes connues. Comme monomères appropriés, on peut utiliser ceux cités ci-dessus, en particulier le méthacrylate de méthyle ou le mélange méthacrylate de méthyle/acrylamide.

          La polymérisation peut être effectuée selon les méthodes habituellement utilisées pour la préparation de particules submicroscopiques de polymères, par exemple selon les  
30       méthodes de polymérisation spécifiées sous I) à IV). La polymérisation ayant lieu en l'absence de la substance biologiquement active, on peut opérer sous des conditions plus énergiques, par exemple en présence d'oxydants tels que des persulfates,  
35       par irradiation ultra-violette ou par chauffage dans un autoclave. Le polymère final doit être pur; pour éliminer les traces

de monomères, on peut procéder selon les méthodes déjà décrites.

Pour obtenir l'adsorption de la substance active, on procède comme suit: on isole ou on concentre les particules submicroscopiques de polymères, par exemple par centrifugation  
5 ou par lyophilisation, on met ces particules en suspension dans un milieu aqueux puis on ajoute ce mélange à une solution, à une émulsion ou à une suspension aqueuses de la substance biologiquement active. La substance active est ainsi adsorbée à la surface des particules de polymères. On isole ensuite le  
10 produit final de préférence par lyophilisation, procédé qui permet d'éliminer les traces résiduelles de monomères et d'augmenter le pouvoir d'adsorption des particules.

On peut également introduire la solution ou la suspension de la substance biologiquement active directement dans  
15 le milieu réactionnel où a eu lieu la polymérisation, sans isoler les particules de polymères, mais dans ce cas on doit mettre en jeu des solutions ou des suspensions de substance active plus concentrées. Par ailleurs, certaines matières polymérisées sous forme de particules submicroscopiques sont dis-  
20 ponibles dans le commerce; il suffit alors de mettre ces particules en suspension dans le milieu liquide contenant la substance biologiquement active.

Les exemples suivants illustrent la présente invention sans aucunement en limiter la portée. Les températures  
25 y sont toutes indiquées en degrés centigrades.

#### Exemple 1

On ajoute 0,4 ml de méthacrylate de méthyle à 50 ml d'une suspension aqueuse d'un virus grippal ayant un degré d'hémagglutination de  $2^{12}$ , on agite le mélange ainsi obtenu  
30 puis on le laisse reposer pendant 1 à 3 jours à 4°. On élimine ensuite l'oxygène en faisant barboter pendant 5 minutes un lent courant d'azote dans le mélange. Après avoir scellé hermétiquement, on irradie le mélange à la température ambiante par une source au  $^{60}\text{Co}$  à raison de 0,46 Mrad. On détermine la disparition du  
35 monomère par titrage acidimétrique en présence de morpholine selon la méthode utilisée pour le dosage des composés  $\alpha, \beta$  insaturés. Le mélange



ainsi obtenu peut être utilisé tel quel comme vaccin, sans autre traitement.

Exemple 2

On procède comme décrit à l'exemple 1, mais on met  
5 en jeu 0,1 ml de méthacrylate de méthyle.

Exemple 3

On procède comme décrit à l'exemple 1, mais on  
utilise un mélange constitué de 0,25 ml de méthacrylate de  
méthyle et de 250 mg d'acrylamide et on l'agite jusqu'à dis-  
10 solution totale.

Exemple 4

On procède comme décrit à l'exemple 1, mais on met  
en jeu 0,2 ml de styrène.

Exemple 5

15 On introduit un mélange contenant une matière poly-  
mérisable et la substance active telles que spécifiées aux  
exemples 1 à 4 ci-dessus, dans un réacteur cylindrique en  
pyrex à double paroi, la réfrigération du réacteur étant  
effectuée par une circulation d'eau (le chemin optique est  
20 de 6 cm). A ce mélange on ajoute, sous agitation, 0,2 mg de  
phosphate sodique de 5-riboflavine et 0,2 mg de persul-  
fate de potassium. Tout en agitant continuellement et en faisant  
barboter un courant d'azote, on irradie le mélange à une  
température constante de  $35 \pm 5^\circ$  au moyen d'une lampe de 300  
25 watts se trouvant à l'extérieur à une distance de 15 cm.  
L'irradiation est effectuée sous ces conditions jusqu'à la  
disparition complète du monomère, soit pendant 5 à 10 heures.

Exemple 6

On procède comme décrit à l'exemple 5, mais on  
30 soumet le mélange à une irradiation ultra-violette à l'aide  
d'une lampe de quartz plongeante (par exemple de 600 watts).  
On irradie jusqu'à la disparition du monomère, soit pendant  
1 à 5 heures.

Exemple 7

35 On ajoute 0,8 ml de méthacrylate de méthyle à 50 ml  
d'une solution physiologique de chlorure de sodium et on poly-

mérise selon la méthode décrite à l'exemple 1. A ce mélange, on ajoute ensuite 50.000 unités d'une solution de chlorhydrate d'insuline (pH 3) et on ajuste sous agitation le pH à 5,6 par addition d'hydroxyde de sodium. L'insuline est ainsi adsorbée sur les particules de polyméthacrylate de méthyle. On ajoute à nouveau 0,3 ml de méthacrylate de méthyle et 200 mg d'acrylamide et on effectue la polymérisation par irradiation avec de la lumière visible selon la méthode décrite à l'exemple 5.

#### Exemple 8

On prépare des particules de polyméthacrylate de méthyle en procédant comme décrit à l'exemple 7. On ajoute ensuite une solution de 100 mg de 13-éthyl-17-éthynyl-17 $\beta$ -hydroxy-4-gonène-3-one dans 10 ml d'éthylèneglycol et on agite le tout pendant 15 minutes. Après addition de 0,2 ml de styrène, on effectue la polymérisation en procédant comme décrit à l'exemple 1.

#### Exemple 9

On introduit 1 ml de méthacrylate de méthyle dans 100 ml d'une solution aqueuse tamponnée au phosphate et contenant 760 mg d'hydrogénophosphate de sodium dihydraté, 145 mg de dihydrogénophosphate de potassium et 480 mg de chlorure de sodium. On agite ce mélange, on y fait barboter pendant 5 minutes un courant d'azote, on scelle hermétiquement et on irradie par une source au  $^{60}\text{Co}$  à raison de 0,46 Mrad. Lorsque la polymérisation est terminée, on centrifuge le mélange pendant 10 minutes à 1500 tours/minute et on élimine la partie supérieure. Après avoir lavé les particules à deux reprises avec, à chaque fois, 100 ml d'un tampon au phosphate, on ajoute 100 ml d'un vaccin antigrippal "fluide" ayant un degré d'hémagglutination de  $2^{12}$  et on agite le tout. Après avoir vérifié l'absence de monomères, on peut utiliser tel quel le vaccin ainsi obtenu pour l'administration par voie parentérale.

#### Exemple 10

On ajoute 0,4 ml de méthacrylate de méthyle à 50 ml d'une solution physiologique de chlorure de sodium. Après avoir éliminé l'oxygène par barbotage d'un courant d'azote, on polymérise le monomère dans un autoclave pendant 2 heures

à 80° et sous 1 atmosphère. On traite ensuite le mélange d'une manière identique à celle décrite à l'exemple 9.

Exemple 11

5 A 50 ml d'une solution physiologique de chlorure de sodium, on ajoute 0,4 ml de méthacrylate de méthyle et 0,1 g de persulfate de potassium. Après avoir éliminé l'oxygène par barbotage d'azote, on chauffe le mélange pendant deux heures à 80° et sous pression normale. On procède ensuite comme décrit à l'exemple 9.

10

Exemple 12

On procède comme décrit à l'exemple 10, mais au lieu d'effectuer la polymérisation dans un autoclave, on irradie par de la lumière ultra-violette pendant 5 heures.

Exemple 13

15 On procède comme décrit à l'exemple 9, mais on remplace le méthacrylate de méthyle par un mélange constitué de 0,35 ml de méthacrylate de méthyle et de 250 mg d'acrylamide.

Exemple 14

20 On procède comme décrit à l'exemple 9, mais on utilise, comme matière polymérisable, 0,2 ml de styrène.

Exemple 15

On procède comme décrit à l'exemple 9, mais on polymérise un mélange constitué de 200 mg de styrène et de 500 mg de méthacrylamide.

25

Exemple 16

On introduit 0,8 ml de méthacrylate de méthyle dans 50 ml d'une solution physiologique de chlorure de sodium et on polymérise par irradiation aux rayons γ comme décrit à l'exemple 9. A la suspension ainsi obtenue, on ajoute 50.000 unités d'une solution de chlorhydrate d'insuline (pH 3) et on ajuste ce mélange sous agitation à un pH compris entre 5 et 6 par addition d'hydroxyde de sodium. On centrifuge ensuite et on sèche les particules ainsi obtenues sur lesquelles l'insuline est adsorbée.

30

35 Les particules submicroscopiques selon l'invention, qui contiennent des substances biologiquement actives totalement

ou partiellement enrobées par le polymère ou adsorbées sur le-  
dit polymère, peuvent être utilisées comme préparations  
médicamenteuses à action prolongée. Ces nouvelles particules  
exercent un effet d'adjuvant. Selon les matières utilisées et  
5 les degrés d'enrobage et d'adsorption obtenus, les particules  
submicroscopiques obtenues selon le procédé spécifié sous a)  
peuvent exercer, à partir d'une seule administration, une  
activité durable et contrôlée, l'organisme étant chargé par  
un minimum de substance active et d'adjuvants. Avec les parti-  
10 cules submicroscopiques préparées selon le procédé spécifié  
sous b), on obtient déjà un bon effet d'adjuvant avec de très  
faibles quantités de matières polymérisées lorsqu'on emploie  
les matières préférées citées.

Les nouvelles particules submicroscopiques sont  
15 appropriées en particulier pour l'administration de vaccins par  
voie parentérale, plus particulièrement de vaccins contre la  
grippe lorsque la substance biologiquement active est constituée  
de virions ou de composants de virus de la grippe. Ces nouvelles  
particules augmentent et/ou prolongent l'effet immunologique  
20 des vaccins, comparés à des vaccins ne contenant pas de matières  
polymérisées. Plus particulièrement elles augmentent la teneur  
en anticorps, comme il ressort des essais suivants.

On a déterminé l'augmentation de la teneur en anti-  
corps chez la souris en effectuant la réaction d'hémagglutination.  
25 On administre par voie intrapéritonéale, à un groupe de 20  
souris femelles pesant chacune 20 g, 62,5 CCA de vaccin anti-  
grippal (A2 / Hongkong X-31), l'antigène étant associé à la  
matière polymérisée sous forme de particules submicroscopiques  
préparées selon l'invention. On effectue un prélèvement de sang  
30 avant la vaccination et 20 jours après la vaccination. Avant  
d'effectuer le titrage, on désactive les sérums par un traite-  
ment au periodate et par un chauffage à 56° pendant 30 minutes.  
Pour évaluer la teneur en anticorps, on détermine l'inhibition  
de l'hémagglutination en procédant selon la méthode de microti-  
35 trage décrite par T.C. O'Brien et coll. dans Appl. Microbiol. 21,  
311 (1971) à l'aide d'un dispositif de pipettage automatique et

et en présence de 0,5% d'érythrocytes de poulet. On compare ensuite ces résultats avec ceux des animaux témoins qui eux ont été traités par un vaccin aqueux ne contenant pas de polymères ou par un vaccin aqueux comportant, comme adjuvant, de l'hydroxyde d'aluminium. On constate, dans cet essai, que les animaux traités par le vaccin de l'invention présentent une teneur élevée en anticorps 20 jours après la vaccination.

L'augmentation de la teneur en anticorps a également été mise en évidence chez le cobaye au moyen de la réaction d'héماغglutination. On administre par voie sous-cutanée des virions de la grippe (B/Hongkong 8/73), l'antigène étant associé à la matière polymérisée sous forme de particules submicroscopiques préparées selon l'invention, à un groupe de 25 cobayes à raison de 400 unités internationales par animal. A chaque animal, on prélève du sang avant la vaccination, 4 semaines puis 8 semaines après la vaccination. Quatre semaines après la vaccination, les animaux reçoivent une injection de rappel de 800 unités internationales des mêmes virions mais exempts de matières polymérisées. On désactive les sérums par traitement avec l'enzyme EDR (receptor destroying enzyme) et par chauffage à 56°, on effectue le titrage selon la méthode indiquée ci-dessus et on compare les résultats avec ceux des animaux témoins. On constate que la teneur en anticorps est élevée chez les animaux ayant reçu le vaccin antigrippal tel que spécifié ci-dessus.

Les particules submicroscopiques selon l'invention et comportant, comme substance biologiquement active, un composé doué de propriétés pharmacologiques peuvent également être utilisées comme préparations médicamenteuses à administrer par voie parentérale ou orale: elles entraînent une libération lente de la substance active dans l'organisme et, de ce fait, prolongent l'effet de la substance active.

REVENDEICATIONS

1.- Un procédé de préparation de particules submicroscopiques contenant une matière polymérisée acceptable physiologiquement et une substance biologiquement active, lesdites  
5 particules formant une solution colloïdale ou une suspension dans un milieu liquide hydrophile ou hydrophobe, caractérisé en ce que

- a) on mélange une suspension, une émulsion, une solution ou une solution colloïdale dans un milieu liquide d'une substance biologiquement active éventuellement adsorbée sur un  
10 support, avec une matière polymérisable soluble dans le milieu liquide utilisé et 0 à 3% en poids d'un stabilisant, puis on soumet le mélange à des conditions entraînant la polymérisation de la matière polymérisable, ou
- 15 b) on adsorbe la substance biologiquement active sur des particules submicroscopiques de matière polymérisée en mettant en suspension des particules de polymères dans un milieu liquide contenant la substance biologiquement active.

2.- Un procédé selon la revendication 1a), caractérisé  
20 en ce qu'on effectue la polymérisation en présence d'un stabilisant dont la concentration n'excède pas 1% en poids du mélange réactionnel.

3.- Un procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la concentration du stabilisant n'excède pas la  
25 concentration micellaire critique du système.

4.- Un procédé selon la revendication 1a), caractérisé en ce que la polymérisation est effectuée en l'absence d'un stabilisant.

5.- Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1a) à 4, caractérisé en ce que la concentration de la  
30 matière polymérisable n'excède pas 2% en poids du milieu réactionnel.

6.- Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1a) à 5, caractérisé en ce que la substance biologiquement  
35 active est adsorbée sur un support.

7.- Un procédé selon la revendication 6, caractérisé

en ce que le support est constitué par des particules submicroscopiques obtenues par polymérisation de la matière polymérisable.

8.- Un procédé selon la revendication 1b), caractérisé en ce qu'on dissout, émulsionne ou met en suspension une matière polymérisable dans un milieu liquide, on polymérise de manière à obtenir des particules submicroscopiques puis on met en suspension ces particules de polymères dans un milieu liquide contenant la substance biologiquement active.

9.- Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1b) et 8, caractérisé en ce qu'on isole par lyophilisation les particules submicroscopiques ayant adsorbé la substance biologiquement active.

10.- Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le milieu liquide contenant la substance biologiquement active est un milieu aqueux.

11.- Un procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le milieu liquide aqueux est une solution physiologique de chlorure de sodium ou une solution physiologique tamponnée au phosphate.

12.- Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la matière polymérisable est le styrène, la vinylpyrrolidone, un dérivé de l'acide acrylique, un dérivé de l'acide méthacrylique ou un mélange de ces produits.

13.- Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'on utilise, comme substance biologiquement active, des antigènes, des protéines, des virus, des bactéries, des cellules, des constituants de virus, de bactéries ou de cellules, des peptides ou des stéroïdes.

14.- Des particules submicroscopiques contenant une matière polymérisée acceptable physiologiquement et une substance biologiquement active, lesdites particules formant une solution colloïdale ou une suspension dans un milieu liquide hydrophile ou hydrophobe, caractérisées en ce qu'elles ont été obtenues selon le procédé spécifié à l'une quelconque des revendications 1 à 13.

15.- Des particules submicroscopiques selon la reven-

dication 14, caractérisées en ce que la substance biologiquement active est enrobée totalement ou partiellement par la matière polymérisée acceptable physiologiquement.

5           16.- Des particules submicroscopiques selon la revendication 15, caractérisées en ce que la substance biologiquement active employée est adsorbée sur un support.

10           17.- Des particules submicroscopiques selon la revendication 16, caractérisées en ce que le support est constitué de particules de matière polymérisée identique à la matière utilisée pour l'enrobage.

15           18.- Des particules submicroscopiques selon la revendication 14, caractérisées en ce que la substance biologiquement active est adsorbée sur les particules submicroscopiques de matière polymérisée.

20           19.- Des particules submicroscopiques selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisées en ce que la matière polymérisée est obtenue par polymérisation du styrène, de la vinylpyrrolidone, d'un dérivé de l'acide acrylique ou méthacrylique ou d'un mélange de ces produits.

20           20.- Des particules submicroscopiques selon la revendication 19, caractérisées en ce que la matière polymérisée est du polyméthacrylate de méthyle ou un copolymère du méthacrylate de méthyle et de l'acrylamide.

25           21.- Des particules submicroscopiques selon l'une quelconque des revendications 14 à 20, caractérisées en ce que la substance biologiquement active est constituée par des antigènes, des virus, des bactéries, des cellules, des constituants de virus, de bactéries ou de cellules, des protéines, des peptides ou des  
30           stéroïdes.

22.- Des particules submicroscopiques selon la revendication 21, caractérisées en ce que la substance biologiquement active est constituée de virus, de virions ou de constituants de virus de la grippe.

35           23.- Des particules submicroscopiques selon la revendication 21, caractérisées en ce que la substance biologi-



quement active est l'insuline.

24.- Des particules submicroscopiques selon l'une quelconque des revendications 14 à 23, caractérisées en ce que leur diamètre est compris entre 50 et 300 nm.

5           25.- L'application en thérapeutique des particules submicroscopiques spécifiées à l'une quelconque des revendications 14 à 24, comme préparations médicamenteuses à action prolongée destinées à être administrées par voie orale ou parentérale.

10           26.- Un vaccin injectable, caractérisé en ce qu'il comprend des particules submicroscopiques telles que spécifiées à l'une quelconque des revendications 14 à 22 et 24, sous forme de suspension ou de solution colloïdale dans un milieu aqueux stérile.

15           27.- Un vaccin antigrippal injectable, caractérisé en ce qu'il comprend des particules submicroscopiques telles que spécifiées à l'une quelconque des revendications 14 à 22 et 24, sous forme de suspension ou de solution colloïdale dans un milieu aqueux stérile.

